

- For more records, click the Records link at page end.
- To change the format of selected records, select format and click Display Selected.
- To print/save clean copies of selected records from browser click Print/Save Selected.
- To have records sent as hardcopy or via email, click Send Results.

☒ Select All

☒ Clear Selections

☐ Print/Save Selected

☐ Send Results

☐ Display Selected

Format

Free

1. ☐ 2/5/1 DIALOG(R)File 352:Derwent WPI (c) 2006 The Thomson Corporation. All rts. reserv.

0003212701

WPI Acc no: 1984-313841/198451

XRAM Acc no: C1984-133704

Compsn. for eliminating the mutagenicity of coffee - contg. catalase or peroxidase, and car  
Patent Assignee: SUNTORY LTD (SUNR)

Inventor: KIYOTA N; KOBAYASHI T; KOMATSUBAR S; KOMATSUBARA S; SUWA Y; YOSI  
Patent Family ( 7 patents, 12 countries )

Patent Number	Kind	Date	Application Number	Kind	Date	Update	Type
EP 128333	A	19841219	EP 1984105033	A	19840504	198451	B
JP 59232049	A	19841226	JP 1983105610	A	19830613	198507	E
			JP 1983170953	A	19830916		
JP 60062945	A	19850411	JP 1983105610	A	19830613	198521	E
			JP 1983170953	A	19830916		
CA 1245554	A	19881129				198901	E
EP 128333	B	19890913	EP 1984105033	A	19840504	198937	E
DE 3479699	G	19891019				198943	E
JP 1992029326	B	19920518	JP 1983170953	A	19830916	199224	E

Priority Applications (no., kind, date): JP 1983105610 A 19830613; JP 1983170953 A 19830613  
Patent Details

Patent Number	Kind	Lan	Pgs	Draw	Filing Notes
EP 128333	A	EN	23	0	
Regional Designated States,Original	AT BE CH DE FR GB IT LI LU NL SE				
CA 1245554	A	EN			
EP 128333	B	EN			
Regional Designated States,Original	AT BE CH DE FR GB IT LI LU NL SE				
JP 1992029326	B	JA	6		Based on OPI patent JP 60062945

Alerting Abstract EP A

Compsn. for eliminating the mutagenicity of coffee contains an enzyme (I) and a non-toxic  
Pref. process uses 0.1-10 esp. 5-10 units of (I)/ml of coffee beverage (contg. 5-20 mg cof  
mg of coffee powder) when peroxidase is used. Alternatively, the treatment may be in the s  
USE/ADVANTAGE - The simple, non-toxic treatment effectively eliminates the cytotoxicit  
taste or flavour.

Title Terms /Index Terms/Additional Words: COMPOSITION; ELIMINATE; MUTAGEN; COF

### Class Codes

#### International Patent Classification

IPC	Class Level	Scope	Position	Status	Version Date
A23F-005/16			Main		"Version 7"
A23F-005/14			Secondary		"Version 7"

File Segment: CPI

DWPI Class: D13; D16

Manual Codes (CPI/A-N): D03-D; D05-A02

Derwent WPI (Dialog® File 352): (c) 2006 The Thomson Corporation. All r

---

<input checked="" type="checkbox"/> Select All	<input type="checkbox"/> Clear Selections	Print/Save Selected	Send Results	Display Selected	Format Free
--	---	---------------------	--------------	------------------	-------------

---

© 2006 Dialog, a Thomson business

## ⑫ 特 許 公 報 (B 2)

平4-29326

⑤ Int. Cl.<sup>5</sup>

識別記号

庁内整理番号

⑭ 公告 平成4年(1992)5月18日

A 23 F 5/16

6844-4B

発明の数 1 (全6頁)

① 発明の名称 突然変異原性のないコーヒー飲料の製造法

前置審査に係属中

② 特 願 昭58-170953

⑤ 公 開 昭60-62945

② 出 願 昭58(1983)9月16日

④ 昭60(1985)4月11日

⑦ 発 明 者 諏 訪 芳 秀 大阪府茨木市山手台6丁目7番16号  
 ⑦ 発 明 者 小 林 巧 大阪府高槻市氷室町1丁目1番10号  
 ⑦ 発 明 者 清 田 紀 子 大阪府吹田市青山台4丁目14番4号  
 ⑦ 発 明 者 小 松 原 佐 和 子 大阪府大阪市住吉区長狭町6番31号  
 ⑦ 発 明 者 吉 栖 肇 大阪府高槻市小曾部町2丁目6番1-612号  
 ⑦ 出 願 人 サントリー株式会社 大阪府大阪市北区堂島浜2丁目1番40号  
 ⑦ 代 理 人 弁理士 湯 浅 恭 三 外3名  
 審 査 官 佐 藤 雪 枝  
 ⑥ 参 考 文 献 特開 昭50-25765 (JP, A)

1

## ⑦ 特許請求の範囲

1 コーヒー飲料に、過酸化水素無添加でペルオキシダーゼを作用せしめることを特徴とする、突然変異原性のないコーヒー飲料を製造する方法。

2 コーヒー飲料がインスタントコーヒーである 5  
 特許請求の範囲第1項の方法。

## 発明の詳細な説明

## (A) 技術分野

本発明は、突然変異原性のないコーヒー飲料の製造法に関する。

## (B) 背景技術

現在、ヒトの癌発生の大部分は、生活環境中の発癌因子に起因していると考えられている。ヒトの癌のうち、遺伝的要因のみで発生する割合は約2%程度に過ぎないと推定される (Higginson, 15  
 J. & Muir, C. S. : J. Natl. Cancer Inst., Vol.63, 1291. : 79)。

ヒトの死亡原因の約1/4~1/5を占める癌の原因としては、我々が日常摂取する飲食品が最も重要視されているし、こうして見解を支持する疫学的 20  
 データは枚挙にいとまがない。

飲食品、医薬品をはじめとする環境因子の発癌性を予見する手段として、近年ヒスチジン要求性

2

を指標としたサルモネラ・テスト (別称、エームス法) が確立された (Ames, B. N. et al. : Mutation Res., Vol.31, 347, '75)。本法により調べられた化合物の突然変異原性と発癌性の間には80~90%の高い相関性が多くの研究機関で認められている (McCann, J. et al. : Proc. Natl. Acad. Sci. (U.S.A.), Vol.72, 5135, '75)。

従つて、突然変異原性をなくすことは発癌リスクからヒトを守る上で少なからぬ効果が期待される。のみならず、突然変異は染色体あるいはDNAに対する障害の結果として起こるものであり、仮に発癌に至らないまでも突然変異原のヒトの健康に及ぼす影響は決して軽視できるものではない。突然変異原性のない飲食品が望まれる所以 10  
 である。

今日、飲食品、嗜好品に含まれることが明らかな突然変異原としては、ベンゾ[a]ピレン、アフラトキシンB<sub>1</sub>、2-アミノフルオレン、ベンズ[a]アンスラセン、クリセン、ジメチルニトロソアミン、β-ナフチルアミン、ニトロソピロリジン、メチルグリオキサールなどがあり、発癌性の証明されている物質が多い。しかし、如何に突然変異原性が認められたとしても、飲食品、嗜

好品のように昔からヒトの生活と密接に結びついている物品の場合には、法的な禁止措置を採ることは無論、これらを避けて生活することもむずかしい。特に嗜好品の中には日常飲食品に比して高い突然変異原性を有するものが多い(表1参照)。

表1 嗜好品の変異活性

嗜好品	復帰変異コロニー数*
紙巻きタバコ1本	5500(TA98、+**)
インスタントコーヒー1杯(150ml)	45000(TA100、-)
レギュラーコーヒー1杯(150ml)	195000(TA100、-)
紅茶1杯(150ml)	38000(TA100、-)
緑茶1杯(150ml)	21000(TA100、-)
煎茶1杯(150ml)	17000(TA100、-)

\* サルモネラ・テイフィムリウム (*Salmonella typhimurium*) TA100株あるいはTA98株を用いた。

\*\* ラット肝ホモジネート(S9ミックス)存在の有無を示す。

(+): S9ミックス添加、(-): S9ミックス無添加。

事実、タバコと口腔咽頭癌、喉頭癌、食道癌、胃癌、肺癌、コーヒーと膵臓癌、膀胱癌、アルコール飲料と食道癌、肝癌などはしばしば相関性が報告されている。

本発明は、食品又は嗜好品の突然変異原性を消滅させるか又はこれを減弱させることによつて、当該物品の安全性を向上させ、ひいては当該物品に対する信頼性を回復させようとするものである。

コーヒーが日常的な飲み物として生活の中に位置づけられたのは1400年代のアラビアと言われている。以後、人間社会の高度な文明化に伴ない嗜好品としての需要が益々高まっている。我が国でも最近コーヒー消費の急速な伸び(1969年以降10年間で約3倍)を記録している。

しかし、近年コーヒーについては様々なかたちで健康への悪影響が懸念され始め、昨年来米においてコーヒー消費が低迷した主要な原因と考えられている。すなわち、カフェインのもつ細胞毒性を始めとして癌との関係、殊にマクメーン博士が指摘したコーヒー飲用と膵臓癌との相関は欧米を

中心にセンセーションを起こした(MacMahon, B. et al.: N. Engl. J. Med. Vol.304, 630, 1981)。膵臓癌以外で、コーヒーによる発癌率の上昇が見られる器官は、膀胱をはじめとする下部泌尿器である(Simon, D. et al.: J. Natl. Cancer Inst., Vol.54, 587, 1975)。更に、前立腺癌、白血病、卵巣癌発生を増加させるという報告もあり、今後更に詳細な調査が待たれる。

先述した突然変異原性についても、コーヒーは10 日常飲食品の中でも高い水準にある(表1参照)。

コーヒーが日常的な飲み物として大量に消費される今日、健康に有害と考えられる諸点を解消することが早急に望まれる。この分野の研究については今日までに多くの成果が出ている。例えば、15 発癌物質のTrp-P-1に対するパーオキシダーゼ、N-メチル-N-ニトロ-N-ニトロソグアニジンに対するチオール化合物、7, 12-ジメチルベンズアンスラセンに対するセレン化合物にそれぞれ発癌物質の突然変異原性不活性化作用が報告されている(Martin, S. E. et al.: Mutation Res., Vol.82, 41, 1981など)。しかしながら、多くの不活性化剤はそれ自体生体に有害であつたり、嗜好性の面で常時飲用に不適當であるため実用化が困難である。

25 ヒトが日頃飲用しても無害で、味、香りなどのコーヒー本来の特性を損なわない物質によつて、コーヒーの細胞毒性や突然変異原性をなくすことは、ヒトの健康を守る上で是非とも必要とされよう。

### 30 (C) 発明の開示

本発明者等は、前記の目的を達成するために、鋭意研究に努め、カタラーゼの抗変異原活性を認め、それに基づく特許出願を行なつた(特願昭58-105610号(特開昭59-232049号公報参照))。

35 従来、コーヒー中の突然変異原としては、メチルグリオキサール、ジアセチルに代表されるジカルボニル化合物が同定され、コーヒーの突然変異原性の原因物質と考えられてきた(L. F. Bjeldanes and H. Chew, Mutation Res., Vol.67, 367, 1979; H. Kasai et al., Gann, Vol.73, 687, 1982)。しかしながら、カタラーゼによる不活性化の事実から、コーヒーの突然変異原性は、フリーラジカルあるいは有機ラジカルが40 直接あるいは間接に関与していることが示唆され

た。

実際に表2に示す如く、コーヒー中の突然変異原性をメチルグリオキサールに代表されるジカルボニル化合物と想定すると、L-システイン(Cys)、ジチオスレイトール(GTT)、還元型グルタチオン(GSH)及びカタラーゼとの反応においてコーヒーとメチルグリオキサールとは、異なつた挙動を示し、矛盾する。すなわちコーヒーの突然変異原性の大部分は、ジカルボニル化合物では説明できないことが判明した。

表 2  
突然変異原性%

添加物(濃度)	メチルグリオキサール*	コーヒー**
—	100	100
HSO <sub>3</sub> —(3.75マイクロモル)	0	0
Cys(4マイクロモル)	0	100
DTT(4マイクロモル)	0	100
GSH(4マイクロモル)	0	100
カタラーゼ(7.5単位)	100	10

\* 0.2マイクロモル(715復帰変異コロニー数/プレートに相当)

\*\* 15mgインスタントコーヒー粉末/プレート(386復帰変異コロニー数/プレートに相当)

本発明者らは、こうした知見に基づき、カタラーゼ以外のラジカル除去酵素について検索したところベルオキシダーゼ(oxidase)がコーヒーの突然変異原性を不活性化することを認めた。

ベルオキシダーゼ(donor: H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>—oxidoreductase, EC 1.11.1.7)の抗変異原作用については下記の物質に対して報告されている。すなわち、Trp-P-1, Trp-P-2(いずれもトリプトファン熱分解産物)、Glu-P-1(グルタミン酸熱分解物)、及び2-アミノ-α-カルボリン(グロブリン熱分解物)(M. Yamadaら、B. B. R. C., Vol.90(3), 769-776, 1979)、自動酸化したリノレン酸(T. Yamaguchiら、Agric. Biol. Chem., Vol.44(4), 959-961, 1980)、2-アミノアンスラセン、トリプトファン熱分解物、エチジウムブロマイド、オルニチン熱分解物(山田宏和ら、特開昭55-37180)がある。これらの物質の突然変異原性の挙動もコーヒ

ーの突然変異原性の挙動と異なることが判明している。すなわちTrp-P-1, Trp-P-2, 2-アミノ-α-カルボリンなど上記の物質は、いずれもフレームシフト型変異を引き起こすが、コーヒーは塩基置換型変異を生ずる。従つてコーヒーの突然変異原性は上記のいずれの物質によつても説明できない。

本発明は、コーヒーの突然変異原性の実体について解析し、新しい知見にもとづき完成した。

すなわち、コーヒーをベルオキシダーゼを配合し、その突然変異原性を低下、消失せしめたこと及び当該操作によつて作られた突然変異原性のないコーヒー飲料は全く新規な事項に属する。

コーヒーの突然変異原性を消失せしめるために必要なベルオキシダーゼの量は、通常飲用する濃度(15mgコーヒー粉末/ml) 1 mlに対して0.1~10単位である。

また、ベルオキシダーゼは、セイヨウワサビ、ダイコン、カブ等の植物由来及び牛乳・白血球等動物由来のもの及び微生物由来のものが使用でき、これらの材料から単離精製されたベルオキシダーゼばかりでなく、精製の各段階で得られる粗ベルオキシダーゼが使用できる。

本発明は、コーヒー飲料に過酸化水素無添加でベルオキシダーゼを作用せしめることを特徴とする突然変異原性のないコーヒー飲料を製造する方法に関する。すなわち、本発明においては、過酸化水素などの過酸化物を添加しないことによつて過酸化水素自体が有している毒性(発癌性など)を排除できる。

本発明の製造方法において、ベルオキシダーゼの作用時期は任意の時点が選択されうる。たとえば、コーヒー豆またはコーヒー豆粉砕物とベルオキシダーゼを混合する(レギュラータイプ)、焙煎したコーヒー豆から抽出したコーヒー液にベルオキシダーゼを添加する(液状コーヒータイプ、例、缶入りコーヒー飲料)、コーヒー豆からその抽出液にベルオキシダーゼ添加後粉末化する(インスタントコーヒータイプ)、あるいは、スプレードライやフリーズドライによつて粉末化したコーヒーにベルオキシダーゼを均質に混ぜ合わせたり、同酵素を液体としてコーヒー粉末に吹きつけること(流動層造粒法; インスタントコーヒータイプ)によつて製造することが可能である。

さらに本発明の方法によれば突然変異原性を消失させるだけでなく、細胞毒性も低下させるという効果も有する。

本発明によつて製造されたコーヒーは、嗜好性も優れており、ヒトの健康へのリスク軽減の目的を達成する上でより望ましい製品を提供できる。

以下実施例により説明する。

#### (D) 実施例

##### (I) 突然変異原性及び突然変異原性抑制効果の測定方法

(i) 方法：ブレインキュベーション法（杉村、長尾；ケミカルミュータジェンス、第6巻、41頁、1981）による。

(ii) 使用菌株：ヒスチジン要求性のサルモネラ・ティフィムリウム（*Salmonella typhimurium*）TA100株（以下“S.TA100株”と略す）。

##### (iii) 試料の調整

(i) インスタントコーヒーの場合：インスタントコーヒー（粉末）は蒸留水に溶かす。一方、所定量のペルオキシダーゼも蒸留水に溶\*

$$\text{抑制率} = \left(1 - \frac{\text{ペルオキシダーゼ添加プレートのコロニー数}}{\text{無添加プレートのコロニー数}}\right) \times 100\%$$

##### (iv) 細胞毒性の測定

動物細胞として、チャイニーズハムスター肺線維芽細胞（以下、CHL細胞と称す）を用いる。CHL細胞（ $5 \times 10^4$ ）をビタミン類とアミノ酸類、及び10%ウシ胎児血清を添加したMEM培地（VAMEM）中で5%CO<sub>2</sub>、37℃で48時間培養した。培養容器としては5.5cm<sup>2</sup>の平底の培受管を用いる。培地は所定濃度のコーヒーを含む10%ウシ胎児血清を含む1mlの\*

$$\text{生存率}(\%) = \frac{\text{処理細胞のプレーティング効率}}{\text{無処理細胞のプレーティング効率}} \times 100$$

##### (v) ペルオキシダーゼ

下記のペルオキシダーゼについて実験した。

1 ペルオキシダーゼ（セイヨウワサビ由来100~150単位/mg：和光純薬工業株式会社大阪）

2 グルタチオンペルオキシダーゼ（ウシ赤血球由来、0.5単位/mg：ベーリンガー・マンハイム山之内株式会社、東京）

3 ラクトペルオキシダーゼ（牛乳由来、40単位/mg：P.Lバイオケミカル社、ウイスコン

シ、両液を50μℓずつ混合する。

(ロ) レギュラーコーヒーの場合：焙煎コーヒー豆をその20g当り250mlの熱蒸留水で抽出し、抽出液をコーヒーフィルターペーパー（カリタ製No.12）で濾過する。濾液を凍結乾燥し、乾重量を測定後、蒸留水に溶かす。一方、所定量のペルオキシダーゼも夫々蒸留水に溶解し、両液を50μℓずつ混合する。

##### (vi) 突然変異原性の測定

前(iii)、(i)~(ロ)により得られた各試料100μℓに、500μℓを0.1Mリン酸ナトリウム緩衝液（pH7.4）に100μℓのS.TA100株培養液を加えたものを加える。この混合液を37℃で20分間振とう後、溶解した2mlの軟寒天に混ぜ、0.1%グルコース寒天プレートに拡げる。なお、前記軟寒天には菌をプレート上で数回分裂させるのに必要な0.1マイクロモル/2ml軟寒天/プレートのヒスチジンを加えておく。37℃で48時間静置後、プレート上のコロニー数を復帰突然変異株として数える。なお、突然変異原性の抑制率は下記の式より算出する。

\* VAMEMに3時間だけ交換する。コーヒーで処理後、CHL細胞はリン酸緩衝液（135mM NaCl、2.7mM KCl、5.3mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>、及び1.45mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>）で細胞をトリプシン処理によつて取り除き、200~400細胞を60mmシャーレに播き、10%ウシ胎児血清を含む5mlのVAMEM中で培養する。平板効率（plating efficiency）は培養7日目に調べた。生存率は下記の式から求めた。

シン、米国)

#### (II) 結果

(i) ペルオキシダーゼのコーヒーの突然変異原性に対する抑制効果。

##### (イ) レギュラーコーヒー

先述の方法で調製したコーヒー豆抽出エキス粉末15mgを蒸留水に溶かし50μℓとする。一方、ペルオキシダーゼを所定量（0.03~15単位）蒸留水に懸濁または溶解して全量50μℓにし、両者を混合して室温で20分間静置す

る。これに0.1Mリン酸ナトリウム緩衝液(pH7.4) 0.5mlと前記S.TA100株の培養液0.1mlを順次混合し、前記(C) (I) (i)の方法によつて突然変異原性を測定し、第1図aに示した結果を得た。

レギュラーコーヒーの突然変異原性は、抽出後凍結乾燥したコーヒー粉末15mgに対してベルオキシダーゼを0.4単位添加すれば、ほとんどもしくは完全に不活性化できる。第1図aで復帰変異コロニー数は0ではないが、本実験における自然発生復帰変異コロニー数(対照)は104であり到底有意に突然変異原性が認められるものではない。通例では対照の200%未満の数値は有意とは認められないので、本図において103以下のコロニー数は0との間に有意差がないものと判断した。これは以下の実験に於いても同様である。

#### (iv) インスタントコーヒー

市販のインスタントコーヒー粉末を用い、レギュラーコーヒーの場合と同様の操作でベルオキシダーゼの抗変異原活性を調べた。結果を第1図bに示す。

インスタントコーヒーの場合も、先述したレギュラーコーヒーと同じくベルオキシダーゼによつて突然変異原性が著しく低減もしくは完全に消失した。すなわち、インスタントコーヒー粉末15mgに対して0.225単位のベルオキシダーゼを添加すれば、その突然変異原性をほとんどもしくは完全に抑制することが可能である。なお、レギュラーコーヒー、インスタントコーヒーともS9ミックス(ラット肝ホモジネートの9000g上澄と還元型ニコチン酸アミドアデニンジヌクレオチド磷酸(NADPH)産生系を合わせたもの)添加によつて一度不活性化した突然変異原性が再び現れることはなかった。

#### (iii) ベルオキシダーゼで処理したコーヒーの細胞毒性。

コーヒー粉末1mgに対してベルオキシダーゼを1単位添加後凍結乾燥した標品を実験開始前に蒸留水にて所定濃度になるように溶解し、膜フィルター(ポアサイズ:0.45 $\mu$ m)にて除菌後、先述した方法Vにより、チャイニーズ・ハ

ムスター肺線維芽細胞(CHL細胞)に対する各種コーヒーの細胞毒性を調べた(表3)。

表 3

5	コーヒー (mg/ml)	ベルオキシダーゼ (単位)	生存率 (%)
	0	0	100
	1	0	39
	2	0	17
	4	0	2
10	0	4	100
	1	1	62
	2	2	58
	4	4	2

その結果、ベルオキシダーゼを配合したコーヒーのCHL細胞に対する細胞毒性は低下した。例えば、コーヒー濃度が2mg/mlでは、CHL細胞の生存率は17%であるが、ベルオキシダーゼを2単位/ml添加したコーヒーでは58%と生存率の上昇が確認された。

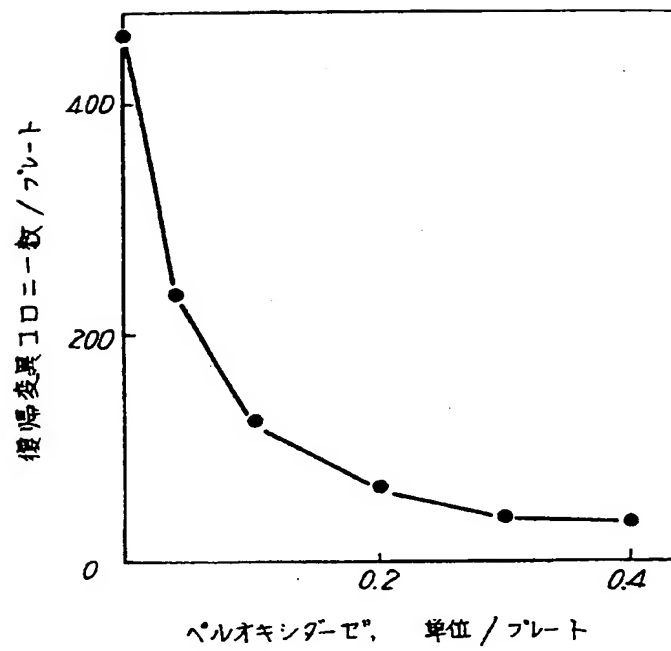
ベルオキシダーゼの種類による差は実験に用いた3種の間では顕著ではない。すなわち、インスタントコーヒー粉末15mgの突然変異原性を抑制するためにはベルオキシダーゼ(セイヨウワサビ製)で、0.3単位、グルタチオンベルオキシダーゼ(ウシ赤血球製)で0.25単位ラクトベルオキシダーゼ(牛乳製)で0.5単位が必要であつた。

また、ベルオキシダーゼ処理して突然変異原性や細胞毒性を低下・消失させたコーヒーは嗜好品本来の味・香りは損なわれていない。

#### 30 図面の簡単な説明

第1図a及び第1図bはそれぞれレギュラーコーヒー、市販インスタントコーヒーに対するベルオキシダーゼの突然変異原性不活性化作用を示すグラフである。ここでコーヒーはインスタントコーヒー15mg/プレートを使用し、ベルオキシダーゼは15単位/プレート添加してある。

第1図 a



第1図 b

